

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Tiedemann

MIKROSOMALE NUKLEOTIDYLTRANSFERASE IN
HÜHNEREMBRYONEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

1972

vorgelegt von

Ernst Noah

aus Quedlinburg

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der

Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Heinz Tiedemann

MIKROSOMALE NUKLEOTIDYLTRANSFERASE IN
HÜHNEREMBRYONEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den Medizinischen Fachbereichen

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ernst Noah

aus Quedlinburg

Referent: Professor Dr.Dr. Heinz Tiedemann

Korreferent: Professor Dr. Elisabeth Köhler



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

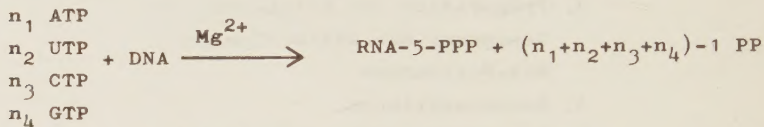
Promoviert am: 24.11.1972

INHALT

	Seite
A. Einleitung und Literaturübersicht	1
B. Material und Methodik	5
I. Material	5
II. Methodik	6
1. Isolierung der Mikrosomenfraktion	6
2. Präparation von Zellkernen zur Gewinnung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	10
3. Enzymreaktionen	11
4. Saccharose-Gradienten Analyse	14
5. Isolierung der mikrosomalen RNA mit Phenol-Dodecylsulfat	15
C. Ergebnisse	18
I. Nachweis der Nukleotidyltransferase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion und Beschreibung der Enzymeigenschaften	18
II. Vergleichende Untersuchung der Eigenschaften der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und der mikrosomalen Nukleotidyltransferase	25
III. Charakterisierung der Reaktionsprodukte	27
IV. Auftrennung der Mikrosomen und Nachweis der enzymatischen Aktivität in den gewonnenen Einzelfraktionen	32
V. Anhang	37
D. Diskussion	40
E. Zusammenfassung	48
F. Literatur	49
G. Zusammenstellung der im Text gebrauchten Abkürzungen	52

A. EINLEITUNG und LITERATURÜBERSICHT

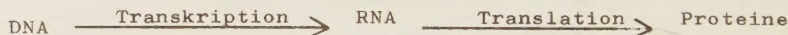
Die Biosynthese aller RNA*-Arten der nicht virusinfizierten Zelle wird durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase katalysiert. Dieses Enzym benötigt DNA als Matritze, die vier in der RNA vorhandenen Ribonukleotide: ATP, CTP, GTP und UTP als Substrate und die Anwesenheit von Magnesium-Ionen. Die Reaktion läßt sich folgendermaßen formulieren:



Der Nachweis der DNA-Abhängigkeit der RNA-Polymerase-Reaktion wurde durch die folgenden experimentellen Befunde erbracht:

1. Bildung spezifischer RNA-DNA Hybride.
2. Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin D.
3. Der enzymatische Abbau der DNA durch Desoxyribonuklease inhibiert die RNA-Synthese.

Es handelt sich bei der beschriebenen Reaktion um eine de novo Synthese von RNA. Dabei wird die im codogenen Strang der DNA gespeicherte Information durch die neugebildete RNA kopiert, ein Prozeß, der als Transkription bezeichnet wird. Dieser Vorgang der Informationsübertragung ist von größter biologischer Bedeutung und stellt einen Teil des von CRICK postulierten zentralen Dogmas der Molekularbiologie dar:



* = Erklärung aller verwendeten Abkürzungen am Ende der Arbeit

Das Enzym RNA-Polymerase ist in einer Vielzahl von Arbeiten sowohl in der Bakterienzelle (CHAMBERLIN u. BERG⁶, 1962; OCHOA u. KRAKOW¹⁹, 1963; NAKAMATO, FOX und WEISS²⁰, 1964) als auch in den Kernen von eukaryonten Zellen beschrieben worden (WEISS³⁰, 1960; RHO u. BONNER²³, 1961; EASON u. SMELLIE¹¹, 1965). Die Arbeitsgruppe ZILLIG¹² konnte die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* isolieren und gereinigt darstellen. RUTTER und Mitarbeitern³ gelang die Isolierung dieses Enzyms aus der Säugerzelle.

Neben der DNA-abhängigen RNA-Synthese sind enzymatische Reaktionen beschrieben worden, bei denen ohne eine DNA-Matrize Ribonukleotide in bereits fertige RNA-Moleküle im Sinne einer Kettenverlängerung eingebaut wurden. Alle beschriebenen Reaktionen benötigen RNA als Startermolekül. Das Vorhandensein aller vier Ribonukleotide ist im Gegensatz zur DNA-abhängigen RNA-Polymerase-Reaktion nicht notwendig.

In der Literatur werden Enzyme, welche diese Reaktion katalysieren, als Homopolymerasen (DALGARNO)⁹ oder Nukleotidyltransferasen (z.B. SMELLIE)^{31,32} bezeichnet. In der folgenden Arbeit wird die Bezeichnung Nukleotidyltransferase gewählt.

HECHT, ZAMECNIK, STEPHENSON, SCOTT¹⁵ (1958), HEIDELBERGER, HARBERS et al.¹⁴ (1959), PREISS, DIECKMANN, BERG²¹ (1960) und DANIEL u. LITAUER¹⁰ (1963) beschrieben die Synthese der terminalen pCpCpA-Sequenz der Transfer-RNA durch ein im Cytoplasma lokalisierendes Enzym. Die Intaktheit dieser Endgruppensequenz ist unbedingte Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit der t-RNA (Bildung der Amonoacyl-t-RNA

durch die Aminoacyl-t-RNA-Synthetase). Dies ist bisher der einzig bekannte Fall eines im Cytoplasma stattfindenden Einbaus endständiger Nukleotide, der mit einer biologischen Funktion korreliert werden kann.

Eine Reihe weiterer Arbeiten beschäftigt sich mit der Untersuchung enzymatischer Aktivitäten verschiedener Zellfraktionen, die den Einbau von Ribonukleotiden katalysieren, ohne daß bisher eine eindeutige funktionelle Erklärung gefunden werden konnte.

Im postmikrosomalen Überstand wurden derartige enzymatische Aktivitäten von folgenden Autoren untersucht: CHUNG, MAHLER u. ENRIONE⁸ (1960); BURDON u. SMELLIE⁵ (1962); KLEMPERER¹⁸ (1963); VENTKATARAMAN u. MAHLER²⁹ (1963).

Der Ribonukleotideinbau durch enzymatische Aktivitäten von Mikrosomenfraktionen wurde sowohl bei Prokaryonten (AUGUST, ORTIZ u. HURWITZ¹, (1963); SMITH u. AUGUST²⁵, 1966) als auch bei Eukaryonten gefunden (STRAUSS u. GOLDWASSER²⁷, 1961; EASON u. SMELLIE¹¹, 1965; DALGARNO, LIU, MARTIN u. WORK⁹, 1966; HORTEN, LIU, MARTIN u. WORK¹⁶, 1966; WILKIE u. SMELLIE^{31,32}, 1968; SCHNEIDER u. KUFF²⁵, 1969).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau von Ribonukleotiden in RNA durch eine Nukleotidyltransferase der Mikrosomenfraktion von Hühnerembryonen untersucht. Bei der Untersuchung der Enzymeigenschaften wurde besonders der Frage nachgegangen, ob die katalysierte Reaktion DNA-abhängig ist und ob der Einbau aller vier Ribonukleotide oder nur eines Ribonukleotids katalysiert wird.

Im einzelnen wurden folgende Probleme bearbeitet:

1. Nachweis von Nukleotidyltransferase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion von Hühnerembryonen.
2. Untersuchung der Eigenschaften der mikrosomalen Nukleotidyltransferase.
3. Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der mikrosomalen Nukleotidyltransferase und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase der Zellkerne.
4. Analyse des Reaktionsproduktes durch Gradienten-Zentrifugation.
5. Auftrennung der Mikrosomen und Nachweis der Nukleotidyltransferase-Aktivität in den gewonnenen Einzelfraktionen.

B. MATERIAL und METHODIK

I. MATERIAL

Reagentien folgender Firmen wurden verwendet:

Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Saccharose (reinst), Trichloressigsäure p.a., Titriplex III p.a., Triäthanolamin p.a., Toluol p.a., und Albumin (aus Rinderserum), Fa. Merck, Darmstadt.

ATP, GTP, CTP, UTP, ADP, GDP, CDP, UDP und Phosphoenolpyruvat, Fa. Boehringer Mannheim.

$\angle 5\text{-}^3\text{H}/\text{UTP}$ und $\angle 5\text{-}^3\text{H}/\text{UDP}$, Amersham; $\angle 5\text{-}^3\text{H}/\text{ATP}$, New England Nuclear. Alle radioaktiv-markierten Substanzen wurden bei -20°C in Äthanol (50 %) gelöst aufbewahrt.

Mercaptoaethanol, Aktinomycin D und Natriumdodecylsulfat, Fa. Serva; Hyamin (1M in Methanol), Fa. Packard; Omni-fluor, Fa. New England Nuclear.

Nukleinsäuren:

Ribonukleinsäure (RNA) = ribosomale RNA aus Bäckerhefe und Desoxyribonukleinsäure (DNA), Fa. Worthington; Polyuridylsäure (Poly-U), Fa. Miles.

Enzyme:

Desoxyribonuklease (DPFF) und Ribonuklease (RASE), Fa. Worthington; Pyruvatkinase, Fa. Boehringer Mannheim.

II. METHODIK

1) Isolierung der Mikrosomenfraktion (abgewandelt nach SCHNEIDER u. KUFF²⁴)

Ausgangsmaterial stellten die Rumpfe von 11 Tage alten Hühnerembryonen dar. Nach Entfernung der Köpfe, Extremitäten und der Eingeweide wurden die Rumpfe mit einer Schere zerkleinert und danach gewogen. Die zerkleinerten Rumpfe wurden in folgender Pufferlösung aufgenommen: $2,5 \times 10^{-3}$ M $\text{Mg}(\text{Cl})_2$, 10^{-3} M NaCl, 10^{-2} M Tris-HCl, 0,25 M Saccharose, pH 8,0; außerdem wurden dem Puffer 0,5 % Triton-X-100 (v/v) zugesetzt. Das Verhältnis von Puffer zu aufgenommenem Gewebe war 3:1 (v/w). Die Homogenisation erfolgte mittels eines locker eingepaßten Dounce-Homogenisators mit 3 bis 5 Strokes. Dieser Arbeitsgang wurde schonend durchgeführt, um möglichst wenige Kerne zu zerstören. Alle Arbeiten wurden im Eisbad bei 0°C durchgeführt.

Die nächsten Aufbereitungsgänge hatten die Entfernung der Kerne, Zelltrümmer, der restlichen ganzen Zellen, Mitochondrien und Lysosomen zum Ziel. Dazu wurden folgende Zentrifugationen durchgeführt:

- a) Entfernen der Kerne, Zelltrümmer und der restlichen ganzen Zellen.

Nach einer 15-minütigen Zentrifugation in einer Christ-Zentrifuge Typ I KS bei 2800 U/Min. ($1500 \times g$, max.) wurde beides, Sediment und Überstand, phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Dabei fand sich im Sediment intakte Zellen, Zellverbände, Zellkerne, Zelltrümmer und Erythrocyten. Der Überstand enthielt Mitochondrien, wenige Kerne und Zelltrümmer. Der Überstand wurde abgehoben und weiter verarbeitet, das Sediment verworfen.

b) Entfernung der Mitochondrien, der restlichen Kerne und Zelltrümmer.

Aus dem gewonnenen Überstand wurden die Mitochondrien, die restlichen Kerne und Zelltrümmer durch folgende Methode entfernt: Es wurde in der präparativen Ultrazentrifuge Spinco L₅₀ 15 Minuten bei 10000 U/Min. (ca. 10000 xg, max.) im Rotortyp Ro 30 bei 0° C zentrifugiert. Das Sediment (Mitochondrien, restliche Zellkerne und Zelltrümmer) wurde verworfen. Der Überstand enthielt noch Mitochondrien.

c) Entfernung der restlichen Mitochondrien und Waschen der Mikrosomen.

Dieser Überstand wurde in der präparativen Ultrazentrifuge Spinco L₅₀ eine Stunde bei 27000 U/Min. (ca. 78000 xg, max.) im Rotortyp Ro 30 bei 0° C zentrifugiert. Damit wurde als Sediment eine rohe Mikrosomenfraktion gewonnen, die noch Mitochondrien enthielt (Nachweis im Phasenkontrastmikroskop). Der Überstand wurde verworfen. Diese Mikrosomenfraktion wurde in dem oben beschriebenen Puffer aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Auf diese Weise konnte der postmikrosomale Überstand abgetrennt und die Mikrosomen gewaschen werden:

Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 10000 U/Min. (ca. 10000 xg, max., Ro 30, Spinco L₅₀, 0° C) wurden die restlichen Mitochondrien sedimentiert und anschließend verworfen.

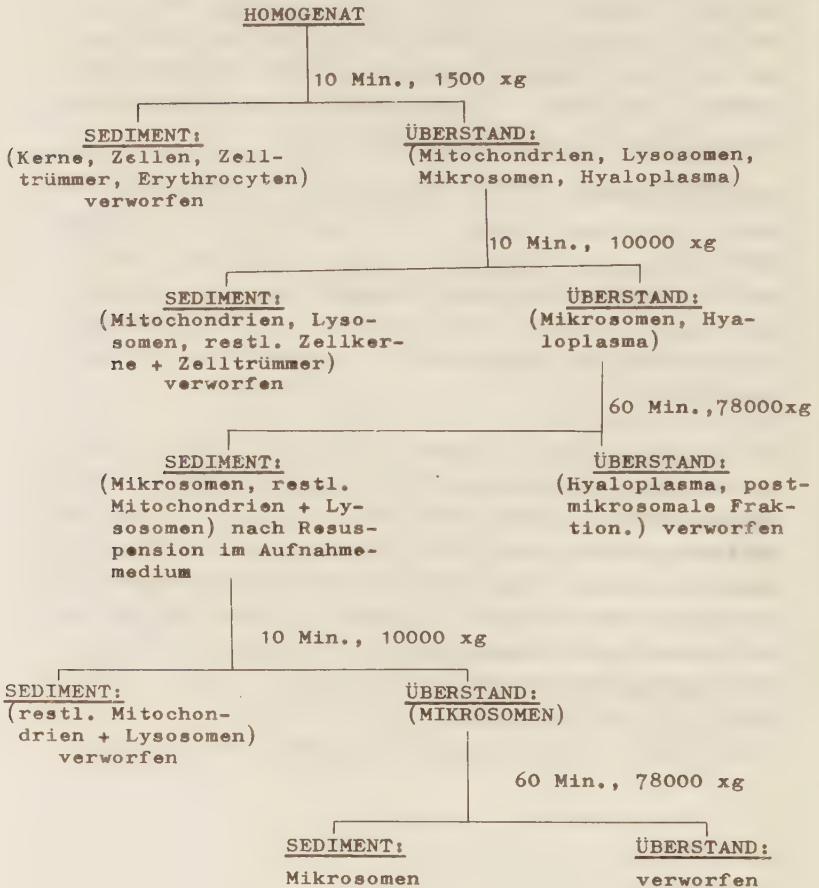
Aus dem Überstand wurden die Mikrosomen mittels Zentrifugation (1 Stunde, 27000 U/Min., 78000 xg, max., Ro 30, Spinco L₅₀, 0° C) als Sediment gewonnen. Dieses Sediment bestand aus zwei deutlich abgrenzbaren Schichten, einer

flockigen, leicht ablösbaren, weißlichen, die nach WILKIE und SMELLIE als "Fluffy Layer" bezeichnet wird und einer dicht gepackten, bernsteinfarbenen, hochviskösen Schicht, die nach den gleichen Autoren als "Pellet" benannt wird. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das gesamte Sediment in einer 50 mM Tris-HCl Pufferlösung, pH 8,1, aufgenommen und im Eisbad mittels Dounce-Homogenisators homogenisiert.

Nach Bestimmung des Proteingehaltes (Biuret-Probe) wurde die Mikrosomensuspension mit der oben beschriebenen Pufferlösung so eingestellt, daß 0,1 ml 1 mg Protein enthielt. Diese Mikrosomensuspension enthielt die enzymatische Aktivität. Sie wurde bis zur Weiterverarbeitung eingefroren und bei -20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Bei einem Teil des Sediments wurde eine Trennung der beiden oben beschriebenen Schichten durchgeführt. Nach Zugabe einer 50 mM Tris-HCl Pufferlösung wurde das leicht ablösbare Fluffy Layer durch vorsichtiges Schütteln suspendiert und die Suspension mit einer Pipette abgehoben. Das Pellet wurde in dem gleichen Medium aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator gleichmäßig suspendiert. Nach Messung des Proteingehaltes wurde mit der oben genannten Pufferlösung auf 1 mg Protein pro 0,1 ml eingestellt und bei -20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Schema der Differentialzentrifugation zur
Gewinnung der Mikrosomen.



2) Präparation von Zellkernen zur Gewinnung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase-Aktivität

(abgewandelt nach CHAUVEAU et al.⁷⁾)

Als Ausgangsmaterial dienten die Rümpfe (siehe oben) von 11 Tage alten Hühnerembryonen. Dieses Material wurde mit einer Schere grob zerkleinert und in einer 0,32 M Saccharoselösung (1 mM an $MgCl_2$) in einem Verhältnis von 1:5 (w/v) aufgenommen. Anschließend wurde mit einem locker eingepaßten Dounce-Homogenisator mild mit 3-5 Strokes homogenisiert. Alle Arbeiten wurden im Eisbad ausgeführt.

Dieses Homogenat wurde in einer Christ-Zentrifuge Typ I KS 15 Minuten mit 2800 U/Min. (ca. 1500 xg, max.) bei 0° C zentrifugiert, um die cytoplasmatischen Bestandteile von den Kernen abzutrennen. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment im oben genannten Medium resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Sediment wurde in einer 1,95 M Saccharoselösung (1 mM an $MgCl_2$) aufgenommen. Mittels eines Dounce-Homogenisators wurde eine gleichmäßige Suspension erzielt. Durch eine anschließende Zentrifugation in einem Titan-50-Rotor der Spinco L Zentrifuge bei 42000 U/Min. (ca. 140000 xg, max., 75 Min., 0° C) konnten die Zellkerne weitgehend von den restlichen unzerstörten Zellen, Zelltrümmern, Bindegewebssubstanzen und restlichen cytoplasmatischen Bestandteilen getrennt werden.

Die Zellkerne wurden nach der Zentrifugation als Sediment im Zentrifugenbecher gefunden und phasenkontrastmikroskopisch kontrolliert. Sie wurden in physiologischer Kochsalzlösung einmal gewaschen und in einer 50 mM Tris-HCl Pufferlösung, pH 8,1 aufgenommen und in einem locker eingepaßten Dounce-Homogenisator mit 8-10 Strokes mild homo-

genisiert. Der Proteingehalt wurde nach der Biuretmethode bestimmt und mit der gleichen Pufferlösung so eingestellt, daß 0,1 ml 1 mg Protein enthielt. Dieses Zellkernhomogenat diente zum Nachweis der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und wurde bis zur Bestimmung der Enzymaktivität bei -20°C in einer Kühltruhe aufbewahrt.

3) Enzymreaktionen

a) Standardreaktion zur Messung der Nukleotidyltransferase-Aktivität

Die Enzymaktivität der Mikrosomenfraktion wurde durch den Einbau von radioaktiv-markierten Ribonukleotiden in säureunlösliche Substanzen bestimmt. Zusammensetzung der Versuchsansätze:

20 μmol Tris-HCl, pH 8,25; 1,25 μmol MgCl_2 ; 5 μmol Mercaptoäthanol; je 0,25 μmol ATP, GTP, CTP; 0,025 μmol UTP + 2 μCi $[5\text{-}^3\text{H}]$ UTP (Amersham, spezifische Aktivität: 2 Ci/mmol), 0,5 μmol Phosphoenolpyruvat; 25 μg Pyruvatkinase (EC2. 7.1.40) und Mikrosomen (1 mg Protein). Das Gesamtvolumen des Standardtestansatzes betrug 0,31 ml.

Nach einer 10-minütigen Inkubation in einem Wasserbad von 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 proz. TCE (1 % an Natriumpyrophosphat) in einem Eisbad gestoppt (Endkonzentration an TCE: 5 %). Der säureunlösliche Niederschlag wurde abzentrifugiert und viermal mit 5 proz. TCE nachgewaschen. Um dabei eine möglichst feine Aufschwemmung des Niederschlages zu erreichen, wurde jeder Testansatz mit Hilfe eines in die Reaktionsgläser eingepaßten Glastempels (Plümper) homogenisiert. Nach der letzten Waschung wurde mit einer Papierfahne die im Reaktionsgefäß befindliche TCE

weitgehend entfernt. Die Niederschläge wurden in je 0,5 ml Hyamin (1 M in Methanol) aufgenommen und anschließend 10 Minuten in einem Wasserbad bei 57° C gelöst. Die in Hyamin gelösten Präzipitate wurden in je 10 ml Toluol-Scintillationslösung (6 g Omnifluor/1 Toluol) aufgenommen und zur Bestimmung der Radioaktivität 2 x 20 Minuten in einem Beckman LS 150 Liquid Scintillation System gemessen.

b) Abwandlungen der Standardreaktion

α) Um zu prüfen, ob die gewonnene Mikrosomenfraktion eine Polynukleotidphosphorylase-Aktivität enthält, wurde die Standardreaktion wie folgt abgeändert:

An Stelle der im Standardreaktionsgemisch enthaltenen Ribonukleosidtriphosphate wurden Ribonukleosiddiphosphate zugesetzt: je 0,25 μmol ADP, CDP, und GDP; 0,025 μmol UDP + 2 μCi [5-³H] UDP (Amersham, spez. Aktivität 4,2 Ci/mmol). Die weitere Zusammensetzung des Reaktionsgemisches entsprach der unter 3a angegebenen. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls 10 Min. (Wasserbad 37° C). Zur Messung der in säureunlösliche Produkte eingebauten Radioaktivitätsmenge wurde wie unter 3a beschrieben verfahren.

β) Zur Charakterisierung der Reaktionsprodukte war es nötig, die Bedingungen der Standardreaktion in folgender Weise zu verändern:

40 μmol Tris-HCl, pH 8,25; 2,5 μmol MgCl_2 ; 10 μmol Mercaptoäthanol; je 0,25 μmol ATP, CTP, GTP; 0,005 μmol UTP + 10 μCi [5-³H] UTP (Amersham, spez. Aktivität: 2 Ci/mmol); 1 μmol Phosphoenlpyruvat, 50 μg Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) und Mikrosomen (2 mg Protein). Das Gesamtvolumen betrug

0,65 ml. Die Versuchsansätze wurden 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Zur Isolierung und Analyse der markierten RNA-Komponenten wurde der oben beschriebene Versuchsansatz verdoppelt. Pro Versuchsansatz wurde jedoch die hinzugefügte Radioaktivitätsmenge von $10\text{ }\mu\text{Ci}$ beibehalten. Die anschließenden Arbeitsgänge, die mit diesen Versuchsansätzen durchgeführt wurden, werden an anderer Stelle beschrieben.

g) In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Mikrosomenfraktion durch Zentrifugation im Saccharosegradienten aufgetrennt und in den einzelnen Fraktionen die Aktivität des Enzyms bestimmt. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

0,2 ml jeder Fraktion wurden zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Zu jedem Versuchsansatz wurden $0,025\text{ }\mu\text{mol}$ ATP, GTP, CTP und $0,0025\text{ }\mu\text{mol}$ UTP + $2\text{ }\mu\text{Ci}$ $[5\text{-}^3\text{H}]\text{UTP}$ (Amersham, spez. Aktivität 2 Ci/mmole) und $50\text{ }\mu\text{g}$ RNA hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches entsprach sonst der unter 3a angegebenen. Das Gesamtvolumen pro Versuchsansatz betrug $0,41\text{ ml}$. Inkubiert wurde 10 Min. bei 37°C . Die weitere Aufarbeitung und die Messung der Radioaktivität wurde wie unter 3a beschrieben durchgeführt.

c) Standardreaktion zur Messung der RNA-Polymerase-Aktivität der Zellkerne

Als Träger der enzymatischen Aktivität wurden ganze Zellkerne eingesetzt (1 mg Protein pro Versuchsansatz). Dem Reaktionsgemisch wurden $0,1\text{ mmole}$ Ammoniumsulfat zugesetzt, die weitere Zusammensetzung entsprach der unter 3a beschrieben. Das Gesamtvolumen der einzelnen Versuchsansätze

sätze betrug 0,31 ml. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37° C wurde die weitere Aufarbeitung und die Messung der Radioaktivität auf die gleiche Weise durchgeführt wie unter 3a beschrieben.

4) Saccharose-Gradienten Analyse

(abgewandelt nach BRITTEN u. ROBERTS⁴)

a) Mit Hilfe dieser Methodik sollte festgestellt werden, in welche Komponenten der Mikrosomenfraktion radioaktiv-markierte Ribonukleotide eingebaut wurden. Das zu untersuchende Material stellten Mikrosomen (2 mg Protein) dar, die gemäß der unter 3bβ beschriebenen Versuchsbedingungen inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 0° C (Eisbad) gestoppt.

Zur Sedimentationsanalyse wurde der auf 0° C abgekühlte Versuchsansatz auf einen linearen Saccharose-Gradienten geschichtet (10,8 ml 10-30 proz. Saccharose). Der Gradient war mit 0,5 ml einer 2 M Saccharoselösung unterschichtet. Alle genannten Saccharoselösungen enthielten folgende Puffersystem (nach W. KNÖCHEL; persönliche Mitteilung): 0,125 M KCl; 5×10^{-3} M $MgCl_2$; 0,02 M Triäthanolamin, pH 7,5. Die Formung des Gradienten und die Materialüberschichtung wurden bei +4° C im Kühlraum durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte 3 Stunden im SW 41 Rotor der Spinco L Zentrifuge mit 40000 U/Min. bei 1° C. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Becherboden mit dem Beckman Recovery-System angestoßen. Die optische Dichte (Extinktion) des Gradienten wurde nach dem continuous-flow Prinzip mit einem LKB Uvicord-Ultraviolet-Absorptiometer (0,3 cm Zelle) bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt. Die Aufzeichnung der Extinktion

erfolgte synchron durch einen Beckman 10"-Recorder. Fraktioniert wurde mit einem LKB 7000 Ultro-Rac Fraktionsammler.

Nach Zugabe von 300 μ g Albumin (0,3 ml einer 0,1 proz. Lösung) zu jeder Fraktion wurde mit 0,2 ml einer 30 proz. TCE-Lösung bei 0° C gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und zweimal mit TCE (5 %) gewaschen. Die Niederschläge wurden in je 0,5 ml Hyamin (1 M in Methanol) unter 10-minütiger Erwärmung im Wasserbad bei 57° C gelöst und nach Abkühlung auf Zimmertemperatur mit je 10 ml Toluol-Scintillationslösung (6 g Omnifluor/1 Toluol) versetzt. Die Radioaktivität wurde im Beckman LS-150-Liquid Scintillation System gemessen.

b) Die oben beschriebene Gradientenzentrifugation wurde in abgewandelter Form zur Auftrennung der Mikrosomen benutzt, um nach der Fraktionierung die enzymatische Aktivität der einzelnen Fraktionen zu bestimmen. Dazu wurden 0,4 ml einer frisch gewonnenen, nicht inkubierten Mikrosomenpräparation (4 mg Protein) auf einen linearen Gradienten (10,8 ml 10-30 proz. Saccharose) geschichtet. Die Zentrifugation, die Elution, die Messung der Extinktion und die Fraktionierung erfolgte auf die gleiche Weise wie unter 4a beschrieben. Das Sediment wurde in 0,6 ml einer 50 mM Tris-HCl Pufferlösung pH 8,1 aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurden 0,2 ml jeder Fraktion auf ihre enzymatische Aktivität untersucht.

5. Isolierung der mikrosomalen RNA mit Phenol-Dodecylsulfat nach ^3H -UTP-Inkubation 13,17,28

0,4 ml einer Mikrosomenfraktion wurden wie unter 2b beschrieben inkubiert (doppelter Ansatz). Durch Zugabe von

10 proz. SDS-Lösung (Endkonzentration 1 %) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde 80 proz. frisch destilliertes Phenol im Verhältnis 1:1 (v/v) zugegeben und 10 Minuten bei 20° C unter intensivem Rühren extrahiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4000 U/Min. und +10° C in der Christ-Zentrifuge Typ I KS. Nach Abheben der überstehenden wässrigen Phase und deren Separierung wurde zu der phenolischen Phase das gleiche Volumen eines 0,4 M Tris-HCl Puffers ($2,5 \times 10^{-3}$ M an MgCl_2), pH 8,25, gegeben und erneut 10 Minuten bei +20° C extrahiert. Zur Phasentrennung wurde wie oben beschrieben zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben und mit der beiseite gestellten o.g. wässrigen Extraktionslösung vereinigt. Die beiden phenolischen Phasen wurden verworfen. Zur Entfernung der restlichen Proteine aus den vereinigten wässrigen Phasen erfolgte eine Nachextraktion (5 Min. bei 20° C) mit einem halben Volumen 80 proz. Phenol. Nach der Phasentrennung (Zentrifugationsbedingungen s. o.) wurde die wässrige Phase sorgfältig abgehoben und mit einer 20 proz. NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % NaCl versetzt und die RNA mit 2 Volumen Äthanol gefällt. Nach 2-stündigem Stehen bei -20° C wurden die Niederschläge abzentrifugiert und dreimal mit 66 proz. Äthanol (0,5 % an NaCl) gewaschen und anschließend in 0,7 ml einer 0,05 M Tris-HCl Pufferlösung (0,03 M an EDTA), pH 7,5, aufgenommen und gelöst.

Die gelöste RNA wurde auf einen linearen Saccharose-Gradienten (10,8 ml 10-30 proz. Saccharose) geschichtet. Die Saccharose war in folgendem Puffersystem gelöst: 0,125 M KCl, $4,5 \times 10^{-3}$ M EDTA, 0,02 M Triäthanolamin, pH 7,5.

Die Zentrifugation erfolgte 9 Stunden bei 40000 U/Min. und 1° C im SW 41 Rotor der Spinco L Zentrifuge. Die Elution des Gradienten, die Messung der Extinktion und die Fraktionierung wurde wie unter 4a beschrieben durchgeführt. Zur Fällung der in den Fraktionen vorhandenen RNA, zur weiteren Aufarbeitung der Präzipitate und zur Messung der eingebauten radioaktiven Nukleotide wurde die unter 4a beschriebene Methode angewendet.

C. ERGEBNISSE

I. Nachweis der Nukleotidyltransferase-Aktivität in der Mikrosomenfraktion von Hühnerembryonen und Beschreibung der Enzymeigenschaften

Die mikrosomale Nukleotidyltransferase-Aktivität wurde unter den in B II, 3a aufgeführten Standardreaktionsbedingungen gemessen. Die Eigenschaften des Enzyms wurden durch die in Tabelle I-V und in Abbildung I-III beschriebenen Veränderungen in der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches untersucht.

1. Allgemeine Reaktionsbedingungen

In Tabelle I sind die allgemeinen Reaktionsbedingungen zusammengefaßt:

Veränderung der Standardreaktion	Einbau pmol UMP/mg Protein	% Einbau (bezogen auf Standardreaktion = 100 %)
Standardreaktion	145,4	100
-PK, -PEP	124,9	86
-Mercaptoäthanol	91,1	63
+ (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,1 mmol)	5,8	4
+Ribonuklease (50 µg)	9,6	7
+Na ₄ P ₂ O ₇ (7,5 µmol)	4,6	3
-Mg ²⁺	28,5	20
+1,25 µmol Ca ²⁺	3,9	3
- Mg ²⁺		

Tab. I: Allgemeine Reaktionsbedingungen

Um optimale Reaktionsbedingungen zu erzielen, war die Anwesenheit des Ribonukleosidtriphosphat-regenerierenden Systems, Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase, sowie Mercaptoäthanol notwendig. Bei Fehlen des Ribonukleosidtriphosphat-regenerierenden Systems war eine geringe Senkung der Einbaurate um 14 % zu beobachten. Wird Mercaptoäthanol dem Reaktionsgemisch nicht zugesetzt, verringerte sich der Einbau um 37 %. Fehlen des Magnesiums verringerte den Einbau auf etwa 20 %. Zusatz von Natrium-pyrophosphat, Ribonuklease und Calcium führte zu einer weitgehenden Hemmung der Reaktion.

2. Abhängigkeit der Reaktion von der Magnesiumkonzentration

Abbildung I beschreibt den durch Zusatz wachsender Magnesiummengen erzielten Effekt. Alle Versuche wurden doppelt durchgeführt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte.

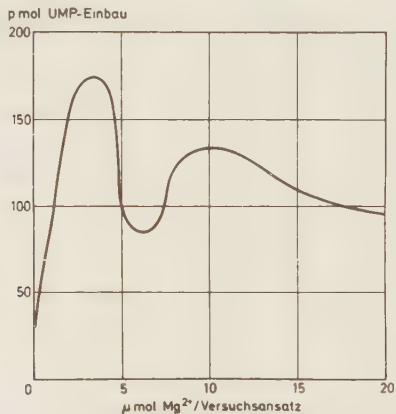


Abb. I: Magnesiumabhängigkeit der mikrosomalen Nukleotidyltransferaseaktivität

Die Kurve ist zweigipfelig. Das erste Optimum liegt bei einer Magnesiumchloridkonzentration von 2-4 μmol pro Versuchsansatz und das zweite, das etwas niedriger ist, bei 8-12 μmol pro Versuchsansatz. Wurde kein MgCl_2 zugesetzt, war noch ein geringer Einbau von ^3H -UTP zu beobachten. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Kontaminierung der Mikrosomensuspension mit dem Magnesiumhaltigen Präparationsmedium zurückzuführen.

3. Stimulation des Ribonukleotideinbaus durch Zugabe von RNA

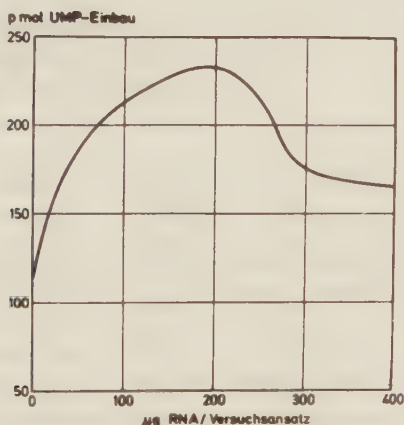


Abb. II: RNA-Abhängigkeit der Reaktion

Bei Zugabe wachsender RNA-Mengen (20-400 μg pro Testansatz) war eine Steigerung der enzymatischen Aktivität zu beobachten. Die maximale Steigerung wurde mit 93 % gegenüber der Standardreaktion beim Hinzufügen von 200 μg RNA erzielt. Bei weiterer Zugabe (300-400 μg RNA) verringerte sich die Einbaurrate wiederum. Gegenüber der

Standardreaktion war die Einbaurrate von ^3H -UTP immer noch um 49 % erhöht.

4. Effekt von Poly-U auf den Nukleotideinbau

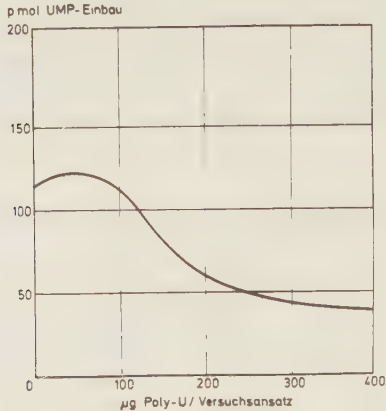


Abb. III: Hemmung des Nukleotideinbaus durch zunehmende Poly-U Konzentration

Die Anwesenheit zunehmender Poly-U-Mengen im Reaktionsgemisch bewirkte nur im Falle des Einsatzes von 50 µg eine geringe Steigerung des Ribonukleotid-Einbaus um ca. 6 %. Proportional zur weiteren Erhöhung der Poly-U Konzentration trat dann eine Inhibition der Reaktion auf.

5. Ribonukleosidtriphosphat-Abhängigkeit der Reaktion

Die Abhängigkeit des Einbaus von Ribonukleotiden in RNA wurde untersucht, indem die Standardreaktionsbedingungen, wie in Tabelle II aufgeführt, verändert wurden.

Veränderung der Ribonukleosidtriphosphatzusammensetzung des Reaktionsgemisches	Einbau pmol UMP/mg Protein	% Einbau (bezogen auf Standardreaktion = 100 %)
Standardreaktion	145,4	100
- ATP	21,9	15
- GTP	167,5	115
- CTP	166,7	115
- CTP, -GTP	91,8	63
- ATP, GTP, CTP	165,5	114

Tab. II: Abhängigkeit des ^3H -UMP-Einbaus von der Triphosphatzusammensetzung des Reaktionsgemisches.

Der von der mikrosomalen Nukleotidyltransferase katalysierte Ribonukleotideinbau zeigte keine Abhängigkeit von der Anwesenheit aller vier Ribonukleosidtriphosphate. Zum Ablauf der Reaktion war lediglich die Anwesenheit eines Triphosphates notwendig. Die Aktivität der Nukleotidyltransferase war hier um ca. 15 % gegenüber der Standardreaktion gesteigert. Unterschiedliche Effekte waren beim Herauslassen nur eines Triphosphates aus dem Reaktionsgemisch zu beobachten: Fehlt nur ATP, sinkt die Einbaurrate um 85 %. Fehlt CTP oder GTP, steigt die Einbaurrate um 15 %. Wurden CTP und GTP fortgelassen, betrug der Einbau nur 63 % von dem der Standardreaktion.

6. Messung der ^3H -ATP-Utilisation

Um zu untersuchen, ob nur UTP ein Substrat des Enzyms ist oder auch andere Nukleotide in RNA eingebaut werden,

wurde als markiertes Ribonukleosidtriphosphat [$5-^3\text{H}$] ATP eingesetzt. Die Zusammensetzung des unter B II, 3a beschriebenen Standardreaktionsgemisches wurde nur in bezug auf die eingesetzten Ribonukleosidtriphosphate verändert. Die in Tabelle III aufgeführten Versuchsansätze enthielten folgende Ribonukleosidtriphosphate: je 0,25 μmol CTP, GTP, UTP und 0,025 μmol ATP + 2 μCi [$5-^3\text{H}$] ATP (New England Nuclear, spez. Aktivität 15,7 Ci/mmol).

	pmol AMP Einbau pro mg Protein	% Einbau (bezogen auf Standardreaktion = 100 %)
Standardreaktion	58,8	100
-Pk, -PEP	37,0	63
+ PP (7,5 μmol)	5,9	10
+ Ribonuklease (50 μg)	25,5	43
- GTP, CTP, UTP	112,8	192

Tabelle III: ATP-Utilisation durch die mikrosomale Nukleotidyltransferase

Die enzymatische Reaktion beim Einsatz von ^3H -ATP als markiertem Substrat zeigte prinzipielle Ähnlichkeit mit der Reaktion beim Einsatz von ^3H -UTP. Die höchste Einbaurrate war beim Fehlen der komplementären Triphosphate zu beobachten. Die Steigerung gegenüber der Standardreaktion betrug 92 % und ist damit wesentlich höher als beim analogen Versuch mit markiertem Uridintriphosphat (Tabelle II). Fehlen des Triphosphat-regenerierenden Systems hatte eine Senkung des Einbaus um 27 % zur Folge. Ribonuklease und Natriumpyrophosphat inhibierten die Reaktion.

7. Ribonukleosiddiphosphate als Substrate der Nukleotidyltransferase

Um nachzuprüfen, ob den Ribonukleosiddiphosphaten eine Substratfunktion zukommt, wurden unter Standardreaktionsbedingungen Diphosphate, von denen Uridindiphosphat markiert war, eingesetzt (B II, 3bd).

eingesetzte Diphosphate	pmol UMP Einbau pro mg Protein
ADP, GDP, CDP, UDP	7,3
ADP, GDP, CDP, UDP + PP	1,1
UDP	8,7
UDP + PP	1,6

Tabelle IV: Ribonukleosiddiphosphate als Substrate der Nukleotidyltransferase

Es konnte im Vergleich zum Einsatz von Ribonukleosidtriphosphaten kein signifikanter Einbau bei Angebot der Ribonukleosiddiphosphate als Substrate gemessen werden.

8. Abhängigkeit der Reaktion von DNA, Desoxyribonuklease und Aktinomycin D

	Einbau pmol UMP/mg Protein	% Einbau (bezogen auf Standardreaktion = 100 %)
Standardreaktion	145,4	100
Aktinomycin D (3 µg)	145,8	100
DNA (125 µg)	138,7	96
Desoxyribonuklease (25 µg) ^a	145,8	100

a = 3 Min. Inkubation mit Desoxyribonuklease vor Ribonukleosidtriphosphatzugabe

Tabelle V: Effekt von Aktinomycin D, DNA und Desoxyribonuklease auf den ³H-UTP Einbau

Die Inkubation mit Desoxyribonuklease und Aktinomycin D blieben ohne Effekt auf den Einbau von ^3H -UTP. Die Zugabe von DNA bewirkte eine geringe, nicht signifikante Verminderung des Ribonukleotideinbaus.

II. Vergleichende Untersuchung der Eigenschaften der
- DNA-abhängigen RNA-Polymerase der Kernfraktion
und der mikrosomalen Nukleotidyltransferase

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um einige generelle Unterschiede in den Eigenschaften beider Enzyme gegenüberzustellen. Die Reaktionsbedingungen wurden bereits unter B II, 3a und 3c beschrieben.

Als wichtigste Unterschiede der beiden Enzyme wurden beobachtet:

1. Die Aktivität der RNA-Polymerase wird durch Zusatz von Ammoniumsulfat um ca. 80 % gesteigert. Die mikrosomale Nukleotidyltransferase dagegen wird inhibiert.
2. Die Inkubation mit Desoxyribonuklease und Aktinomycin D hemmen den durch die RNA-Polymerase katalysierten Einbau von Ribonukleotiden. Der Zusatz beider Substanzen zeigt keinen Effekt auf die Nukleotidyltransferaseaktivität.
3. Die RNA-Polymerase benötigt alle Ribonukleosidtriphosphate als Substrate. Beim Fehlen eines Triphosphates oder der drei komplementären Ribonukleosidtriphosphate tritt eine Hemmung der Reaktion ein. Die mikrosomale Nukleotidyltransferase zeigt im Gegensatz dazu einen höheren Einbau bei Anwesenheit nur eines Triphosphates. Die Zugabe der drei komplementären Triphosphate führt zu einer Hemmung.

Tab. VI: Vergleich der Eigenschaften der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und der mikrosomalen Nukleotidyltransferase

Enzym:	DNA-abhängige RNA-Polymerase der Zellkerne		Nukleotidyltransferase der Mikrosomen	
	pmol UMP-Einbau pro mg Protein	% Einbau bezogen auf Standardreaktion = 100%	pmol UMP-Einbau pro mg Protein	% Einbau bezogen auf Standardreaktion = 100%
Standardreaktion (+0,1 mmol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	139,9	100	145,4	100
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	28,9	21	5,8	4
- GTP, CTP, ATP	10,4	7	165,5	114
- ATP	13,5	10	21,9	15
- CTP	47,9	34	166,7	115
- GTP	43,8	32	167,5	115
+ Desoxyribonuklease (25 μg) ^a	54,8	39	145,8	100
+ Aktinomycin D	65,5	47	145,8	100
+ Ribonuklease (50 μg)	3,3	2	9,6	7
+ PP (7,5 μmol)	3,9	3	4,6	3
+ 1,25 $\mu\text{mol Ca}^{2+}$ - Mg	11,1	8	3,9	3

a = 3 Minuten Vorinkubation mit Desoxyribonuklease vor Ribonukleosidtriphosphat-Zugabe

4. Zugabe von RNA hat keinen Effekt auf die RNA-Polymerase-Aktivität. Die mikrosomale Nukleotidyltransferase zeigt eine deutliche RNA-Abhängigkeit.
5. Die Aktivität beider Enzyme wird durch Natriumpyrophosphat, Ribonuklease und Calcium gehemmt.

III. Charakterisierung der Reaktionsprodukte

1. ^3H -UTP Einbau in Einzelkomponenten der Mikrosomenfraktion

0,2 ml einer Mikrosomensuspension (2 mg Protein) wurde 5 Minuten bei 37°C mit ^3H -UTP inkubiert (Methodik siehe B II, 3bB) und anschließend mittels Zentrifugation im Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Nach Fraktionierung des Gradienten wurde in den einzelnen Fraktionen die Radioaktivität bestimmt (B II, 4a).

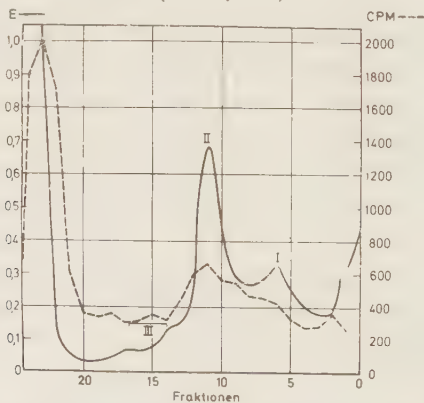


Abb. IV: Sedimentationsdiagramm der Mikrosomenfraktion nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C mit ^3H -UTP

———— = Extinktion bei 254 nm
----- = Radioaktivität (CPM)

Die Extinktionskurve zeigt die Komponenten der Mikrosomenfraktion: Polysomen in den Bodenfraktionen des Gradienten, Disomen (Peak I), Monosomen = 80s Partikel (Peak II), die 60s und 40s Untereinheiten der Monosomen (III) und die langsam sedimentierenden Anteile (Proteine, s-RNA). Die Aktivitätskurve folgt der Extinktionskurve im Bereich der Polysomen, Disomen und Monosomen sowie der Untereinheiten. Die Disomen, Monosomen und die Untereinheiten enthalten zusammen 39 % der gesamten Radioaktivität. Im Bereich der langsam sedimentierenden Komponenten liegt ein höherer Aktivitätspeak, der 49 % der Gesamtaktivität ausmacht. Ein Teil dieser Radioaktivität könnte durch Adsorption bedingt sein. Im Sediment betrug die gemessene Radioaktivität 4 % der Gesamtaktivität.

Die gleiche Menge nicht inkubierter Mikrosomen wurde einer Saccharose-Gradienten Analyse unterworfen, um evtl. durch die Inkubation bedingte Veränderungen im Mikrosomen-Profil festzustellen.

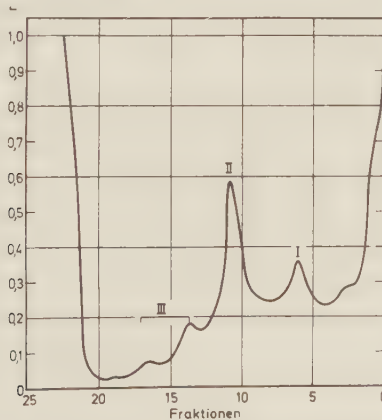


Abb. V: Sedimentationsdiagramm einer nicht inkubierten Mikrosomenfraktion

— = Extinktion bei 254 nm

Bei einem Vergleich der Abb. IV mit der Abb. V fällt eine Verringerung der Disomenfraktion auf. Der Monosomen-Peak der inkubierten Probe (Abb. IV) hat gegenüber der nicht inkubierten Probe (Abb. V) zugenommen. Im Bereich der Ribosomenuntereinheiten sind die Peaks nach Inkubation weniger scharf ausgeprägt. Die beobachteten Effekte waren bei der Wiederholung der Versuche reproduzierbar. Sie deuten darauf hin, daß während der Inkubation ein Teil der Polysomen und Disomen abgebaut wurde.

2. Einbau von ^3H -UTP in die RNA-Komponenten der Mikrosomenfraktion

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Aktivitätsverteilung nach Inkubation der Mikrosomen (Abb. IV) läßt auf einen Nukleotideinbau sowohl in die Ribosomen wie auch in die langsam sedimentierenden Komponenten schließen. Eine Adsorption von nicht eingebautem ^3H -UTP ist jedoch nicht auszuschließen. Das Reaktionsprodukt wurde deshalb durch Isolierung der RNA weiter charakterisiert.

0,4 ml einer Mikrosomensuspension wurden unter abgewandelten Standardreaktionsbedingungen 5 Min. bei 37°C inkubiert (B II, 3b). Anschließend wurde die RNA nach der Dodecylsulfat-Phenolmethode isoliert (B II, 5) und die einzelnen RNA-Komponenten durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten getrennt. Parallel wurde aus 0,3 ml einer nicht inkubierten Mikrosomenfraktion nach der gleichen Methodik die RNA isoliert und aufgetrennt. Zweck dieses Vorgehens war es, die Auswirkungen der Ribonukleaseaktivität während der Inkubation festzustellen.

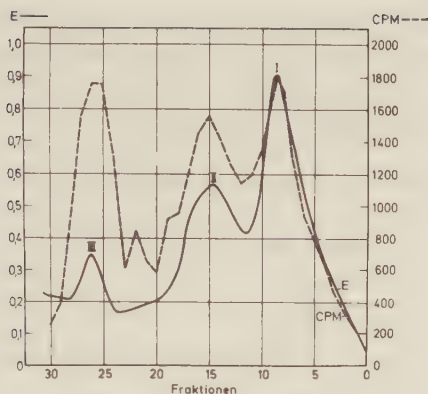


Abb. VI: Sedimentationsdiagramm der mikrosomalen RNA nach Inkubation (5 Min.) mit ^3H -UTP.

———— = Extinktion bei 254 nm
 - - - - - = Radioaktivität (CPM)

Die Extinktionskurve zeigt drei deutliche Peaks, hervorgerufen durch die 28s (Peak I), 18s (Peak II) und 4-5s RNA (Peak III). Der 18s Peak zeigt Schulterbildung. Dies läßt auf Ribonukleaseeinwirkung während der Inkubation schließen. Die Aktivitätskurve zeigt vier Peaks, drei davon sind korreliert mit den Peaks der Extinktionskurve, also mit der 28s, 18s und 4-5s RNA. Der vierte Peak befindet sich in der 12-9s Region (geschätzt). Die Radioaktivitätskurve folgt der asymmetrischen Form der Extinktionskurve und zeigt die gleiche Schulterbildung. Weitere Versuche zeigten gleiche Verteilung der Aktivität. Das Sedimentationsdiagramm der aus einer nicht inkubierten Mikrosomenfraktion isolierten RNA ist dem der inkubierten Probe (Abb. VI) sehr ähnlich. Der 18s Peak zeigt in diesem Diagramm keine Schulterbildung.

Auffällig ist die Mengenverteilung der Radioaktivität in Relation zu der gemessenen Extinktion. Um diese Beziehung mathematisch zu beschreiben, wurde die spezifische Aktivität berechnet.

Die spezifische Aktivität ist definiert als:

$$\text{IPM spez.:} = \frac{\text{IPM total}}{E_{254 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} \times V}$$

IPM = Impulse pro Minute

IPM total = Impulse pro Minute und Fraktion

E = Extinktion (Wellenlänge = 254 nm; Schichtdicke 1 cm)

V = Volumen der Fraktion

Die spezifische Aktivität gibt also die Impulse pro Minute für die in einem ml gelöste RNA (ausgedrückt in Extinktionseinheiten) an. Da der Extinktionswert 1 bei einer Wellenlänge von 254 nm einer RNA Konzentration von ca. 40 µg pro ml entspricht, gibt die spezifische Aktivität die Radioaktivitätsmenge pro 40 µg RNA an.

Es ergeben sich für die Peakfraktionen folgende Werte der spezifischen Aktivität (Rechnung siehe Anhang):

4-5s Peakfraktion: IPM spez. = 3108

18s Peakfraktion: IPM spez. = 1667

28s Peakfraktion: IPM spez. = 1221

Die Peakfraktion der 28s RNA zeigt die niedrigste, die der 4-5s RNA die höchste spezifische Aktivität.

Die experimentellen Ergebnisse lassen weitergehende Schlußfolgerungen hinsichtlich der Primerfunktion der einzelnen RNA-Komponenten zu, wenn die gemessene Radioaktivität der einzelnen Peakfraktionen auf nmol RNA bezogen wird. Zur Berechnung wurde die folgende Methode gewählt. Der genaue Rechengang wird im Anhang beschrieben.

Mit Hilfe der errechneten Extinktionseinheiten (1 Extinktionseinheit = $40 \mu\text{g RNA}$) wird die RNA-Konzentration der Peakfraktionen in $\mu\text{g/ml}$ berechnet. Aus diesen Werten läßt sich die RNA-Konzentration der Peakfraktionen in nmol/ml bestimmen. Der Berechnung werden die von SPIRIN und GAVRILOVA in "The Ribosome"²⁶ angegebenen Molekulargewichte zugrunde gelegt. Die aus der Aktivitätskurve (Abb. VI) entnommenen CPM-Werte der Peakfraktionen werden auf 1 ml bezogen. Mit den errechneten Werten läßt sich die eingebaute Radioaktivitätsmenge in CPM/nmol RNA bestimmen.

Ergebnis:

4-5s RNA = 1466 CPM/nmol
18s RNA = 12683 CPM/nmol
28s RNA = 19523 CPM/nmol

Es konnte somit gezeigt werden, daß ein bevorzugter Einbau von Ribonukleotiden in die 28s und 18s RNA stattfand. Das Verhältnis der eingebauten Radioaktivitätsmenge der einzelnen RNA-Komponenten beträgt:

4-5s RNA : 18s RNA : 28s RNA = 1 : 8,8 : 13,3

IV. Auftrennung der Mikrosomen und Nachweis der enzymatischen Aktivität in den gewonnenen Fraktionen

1. Die enzymatische Aktivität der Fluffy Layer-Fraktion und der Pellet-Fraktion

Die grobe Trennung der Mikrosomen in die beiden oben genannten Fraktionen wurde wie unter B II,1 beschrieben durchgeführt. Beide Fraktionen wurden einer Saccharose-Gradienten Analyse unterworfen (Methodik B II, 4a).

Im Sedimentationsdiagramm der in B II,1 beschriebenen Pellet-Fraktion zeigte sich das gleiche Extinktionsprofil wie in Abb. V. Es ist deshalb hier nicht dargestellt. Abb. VII zeigt das Sedimentationsdiagramm der Fluffy Layer-Fraktion.

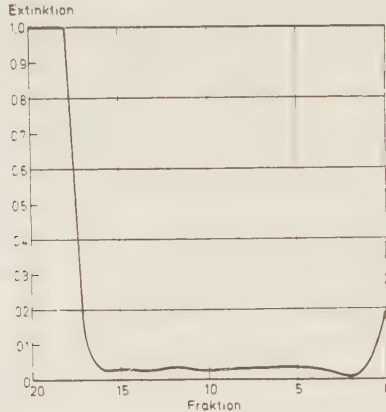


Abb. VII: Sedimentationsdiagramm der Fluffy Layer Fraktion

— = Extinktion bei 254 nm

Aus Abb. VII geht hervor, daß in der genannten Fraktion die ribosomalen Komponenten fehlen.

Unter Standardbedingungen wurde die enzymatische Aktivität beider Fraktionen bestimmt.

Fraktion:	Einbau pmol UMP pro mg Protein	% Einbau be- zogen auf Stan- dardreaktion = 100 %
Pellet	218,0	150
Fluffy Layer	52,2	36
gesamte Mi- krosomen- fraktion	145,4	100

Tabelle VII: Enzymatische Aktivität der Mikrosomen-
subfraktionen

Die Pellet-Fraktion enthält die höchste enzymatische Aktivität, die um 50 % über der enzymatischen Aktivität der gesamten Mikrosomenfraktion liegt. In der Fluffy Layer-Fraktion konnte nur 36 % der enzymatischen Aktivität (jeweils auf gleiche Proteinmengen bezogen) nachgewiesen werden.

Wird die enzymatische Aktivität nicht auf mg Protein bezogen, sondern auf g Gewebe aus dem die Fraktionen gewonnen wurden, gelangt man zu folgendem Ergebnis:

Fraktion	pmol UMP-Ein- bau pro g Ge- webe
Pellet	211,9
Fluffy Layer	77,3
gesamte Mikro- somenfraktion	305,3

Tab. VIII: Enzymaktivität der aus 1 g Gewebe gewonnenen
Mikrosomen-Subfraktionen

Aus Tab. VIII geht hervor, daß die Pellet-Fraktion ca. 70 % der gesamten Enzymaktivität des untersuchten Gewebes enthält, während in der Fluffy Layer-Fraktion nur 25 % nachgewiesen werden kann.

2. Auftrennung der Mikrosomen mittels Saccharose-Gradienten-Zentrifugation und Bestimmung der Enzymaktivität der gewonnenen Einzelfraktionen

0,4 ml einer Mikrosomensuspension werden durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt und anschließend fraktioniert (Methodik: B II, 4b). Die enzymatische Aktivität von 0,2 ml jeder gewonnenen Fraktion wurde wie unter B II, 3b) aufgeführt bestimmt.

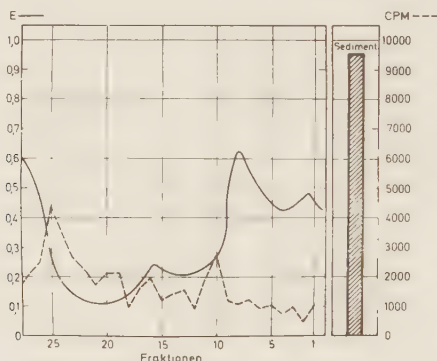


Abb. VIII: Sedimentationsdiagramm einer Mikrosomenfraktion und die Bestimmung der Enzymaktivität der gewonnenen Einzelfraktionen

———— = Extinktion bei 254 nm

- - - - - = Einbau pro Einzelfraktion (CPM)

Als Ergebnis dieses Experimentes (Abb. VIII) lassen sich folgende Aussagen treffen:

- a) Alle Fraktionen besitzen eine Enzymaktivität.
- b) Die höchste ^3H -UTP-Einbaurrate ist im Sediment zu finden.
- c) Ein Aktivitätspeak befindet sich unmittelbar vor den langsam sedimentierenden Komponenten der Mikrosomen.

V. Anhang

1. Berechnung der spezifischen Aktivität.

$$\text{IPM spez.} = \frac{\text{IPM total}}{1 \text{ cm}} \\ E_{254 \text{ nm}} \times V$$

IPM total = Impulse pro Minute und Fraktion.

Die Werte werden der Aktivitätskurve
(Abb. VI) entnommen.

E = Extinktion (Wellenlänge = 254 nm; Schichtdicke = 1 cm). Zur Berechnung dieses Wertes wird die pro Peakfraktion gemessene Extinktion der Extinktionskurve (Abb. VI) entnommen und mit dem Faktor 4,3 multipliziert, da die gemessene Extinktion in einer zylindrischen Meßzelle (Durchmesser 0,3 cm) bestimmt wurde. Der zur Berechnung der spezifischen Aktivität geforderte Extinktionswert ist jedoch durch Messung in einer kubischen Küvette (Schichtdicke 1 cm) zu bestimmen. Zur Berechnung dieses Faktors wurden Extinktionsmessungen von RNA-Lösungen bekannter Konzentration im LKB-Uvicord Ultraviolet Absorptiometer (zylindrische Meßzelle, Durchmesser 0,3 cm) sowie im Zeiss-Photometer (kubische Küvette, Schichtdicke 1 cm) durchgeführt. Die Wellenlänge betrug jeweils 254 nm. Aus den gemessenen Werten wurde der Faktor 4,3 berechnet.

V = Volumen der Peakfraktion = 0,38 ml

Durchführung der Rechnung:

$$\begin{array}{rcl} & & 1759 \\ \text{4-5s Peakfraktion: IPM spez.} & = & \frac{1759}{0,35 \times 4,3 \times 0,38} \\ & = & 3108 \\ & = & \text{====} \end{array}$$

$$\begin{aligned}
 18s \text{ Peakfraktion: IPM spez.} &= \frac{1552}{0,569 \times 4,3 \times 0,38} \\
 &= 1667 \\
 &====
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 28s \text{ Peakfraktion: IPM spez.} &= \frac{1804}{0,904 \times 4,3 \times 0,38} \\
 &= 1221 \\
 &====
 \end{aligned}$$

2. Berechnung der eingebauten Radioaktivität (CPM)
pro nmol RNA.

a) Berechnung der RNA Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ und
nmol/ml

Zunächst werden die Extinktionseinheiten pro ml Peakfraktion bei einer Schichtdicke von 1 cm berechnet. Die jeweilige Extinktion der Peakfraktion wird aus Abb. VI abgelesen und mit 4,3 multipliziert (siehe oben) und anschließend durch 0,38 dividiert, da das Volumen der Peakfraktion 0,38 ml beträgt.

Extinktionseinheiten pro ml Peakfraktion (Schichtdicke 1 cm):

4-5s Peakfraktion = 3,925
18s Peakfraktion = 6,439
28s Peakfraktion = 10,229

Da eine Extinktionseinheit der RNA Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ entspricht, gilt für die RNA Konzentration der Peakfraktionen:

4-5s Peakfraktion = 157,0 μg RNA/ml

18s Peakfraktion = 257,6 μg RNA/ml

28s Peakfraktion = 409,2 μg RNA/ml

Zur Umrechnung der Konzentrationseinheit $\mu\text{g}/\text{ml}$ in nmol/ml werden folgende Molekulargewichte zugrunde gelegt: (nach SPIRIN und GAVRILOVA: "The Ribosome")²⁶ Molekulargewicht der 28s RNA = $1,7 \times 10^6$

18s RNA = $0,8 \times 10^6$

4-5sRNA = 5×10^4

Ergebnis:

4-5s Peakfraktion = 3,14 nmol/ml

18s Peakfraktion = 0,322 nmol/ml

28s Peakfraktion = 0,241 nmol/ml

b) Berechnung der Radioaktivitätsmenge (CPM) pro nmol RNA

Die aus der Aktivitätskurve (Abb. VI) entnommenen CPM-Werte der Peakfraktionen werden zunächst auf 1 ml bezogen:

4-5s Peakfraktion = 4605 CPM/ml

18s Peakfraktion = 4084 CPM/ml

28s Peakfraktion = 4705 CPM/ml

Mit den errechneten Werten läßt sich die eingebaute Radioaktivitätsmenge in CPM/nmol RNA bestimmen:

4-5s RNA = 4605 CPM/ml : 3,14 nmol/ml = 1466 CPM/nmol

18s RNA = 4084 CPM/ml : 0,322 nmol/ml = 12683 CPM/nmol

28s RNA = 4705 CPM/ml : 0,241 nmol/ml = 19523 CPM/nmol

D. DISKUSSION

In der Mikrosomenfraktion von Hühnerembryonen konnte eine Nukleotidyltransferase nachgewiesen werden, die den Einbau von Ribonukleotiden in RNA katalysiert. Das Enzym benötigt zur optimalen Aktivität den Zusatz von Merkaptoäthanol. Die Zugabe eines Ribonukleosidtriphosphat-regenerierenden Systems führte zu einer geringen Steigerung des Einbaus.

Die enzymatische Reaktion ist Magnesium-abhängig. Es sind zwei Konzentrationsoptima feststellbar. Dieses könnte auf das Vorhandensein von zwei Magnesium-abhängigen Enzymen hindeuten.

Die durch die Nukleotidyltransferase katalysierte Reaktion ist RNA-abhängig. RNA besitzt die Funktion eines Startermoleküls (Primer). Die Anzahl der an das 3'-Ende angehängten Ribonukleotide ist dabei nicht bekannt. Der Nachweis der RNA-Abhängigkeit der Reaktion konnte nur indirekt durch Zugabe exogener RNA geführt werden, da das Enzym nicht in gereinigter Form vorliegt, also stets mit endogener mikrosomaler RNA vergesellschaftet ist.

Für Poly-U konnte keine Primerfunktion beobachtet werden. Poly-U hemmt unter den gegebenen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit von der Konzentration die Reaktion. Das kann entweder darauf zurückgeführt werden, daß Poly-U keine Primerfunktion besitzt oder aber, daß die gewählten Konzentrationen an Poly-U zu hoch waren. Durch eine Anlagerung von Poly-U an die mikrosomale RNA könnte

diese so verändert werden, daß die Primerfunktion verloren geht.

Die Reaktion ist unabhängig von der Anwesenheit aller vier Ribonukleosidtriphosphate im Reaktionsgemisch. Dieser Effekt läßt auf das Anhängen eines Nukleotids an das 3'-Ende der Primer-RNA oder die Synthese einer endständigen homopolymeren Sequenz schließen, wenn auch die Synthese einer heteropolymeren Sequenz nicht völlig auszuschließen ist, da in der Mikrosomenfraktion noch geringe Mengen an Triphosphaten vorhanden sein könnten (STRAUSS u. GOLDWASSER)²⁷. Die Synthese einer heteropolymeren Sequenz ist aber nicht wahrscheinlich, da die gleiche Einbaurrate von ³H-UTP beobachtet wurde, wenn der geringe endogene ATP-Spiegel in den Mikrosomen vor Zugabe von ³H-UTP durch Inkubation mit einem ATP-verbrauchenden System (Hexokinase/Glucose) gesenkt wurde.

Das Angebot aller vier Ribonukleosidtriphosphate führte zu einer Senkung der Einbaurrate. Dieses Ergebnis könnte auf folgende Weise gedeutet werden:

1. Es könnte eine kompetitive Hemmung des UTP-Einbaus bei Angebot anderer Triphosphate, die von dem Enzym ebenfalls an vorhandene RNA-Ketten angehängt werden, vorliegen. Dabei könnten durch das gleiche Enzym alle vier Triphosphate an das 3'-Ende von vorhandenen RNA-Ketten angehängt werden.
2. Es ist nicht auszuschließen, daß das Enzym nur UTP einbaut und die im Reaktionsgemisch vorhandenen anderen Triphosphate den Einbau hemmen.

Die vergleichende Untersuchung der Eigenschaften der mikrosomalen Nukleotidyltransferase und der DNA-abhängigen RNA-Polymerase der Zellkerne hatte zum Ziel, festzustellen, ob es sich bei der in den Mikrosomen gefundenen enzymatischen Aktivität um eine spezielle Nukleotidyltransferase handelt oder um eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, welche entweder physiologisch im Cytoplasma vorkommen könnte (siehe BELL)² oder aber durch eine präparationsbedingte Kontamination (Zerstörung der Zellkerne während der Präparation) mit der Mikrosomenfraktion vergesellschaftet ist. Die unterschiedlichen Effekte der Inkubation mit Aktinomycin D, Desoxyribonuklease und Ammoniumsulfat, die unterschiedliche Ribonukleosidtriphosphat-Abhängigkeit und die Unterschiede in der DNA-Abhängigkeit beider Enzyme beweisen, daß das mikrosomale Enzym mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase nicht identisch ist. Offenbar kommt in der untersuchten Mikrosomenfraktion keine DNA-abhängige RNA-Polymerase vor. Die in dieser Arbeit beschriebene mikrosomale Nukleotidyltransferase besitzt sicher keine Funktion bei der Informationsübertragung bei der Proteinbiosynthese, da die von diesem Enzym katalysierte Reaktion folgende bereits genauer beschriebene Eigenschaften aufweist:

1. DNA-Unabhängigkeit
2. UTP wird allein ohne die anderen Ribonukleosidtriphosphate eingebaut.
3. Das Enzym benötigt RNA als Primer.

Der Einbau von 5-³H-UDP in die Mikrosomenfraktion findet nicht statt. Die geringen Einbauraten, die gemessen wurden, sind wahrscheinlich auf ein in den Mikrosomen befindliches Ribonukleosidtriphosphat-regenerierendes

System zurückzuführen. Eine Polynukleotidphosphorylase ist in der Mikrosomenfraktion offenbar nicht vorhanden.

Die Analyse der isolierten RNA-Komponenten zeigt einen Einbau unterschiedlicher Höhe in alle vorhandenen RNA-Komponenten. Es wurde ein Ribonukleotideinbau in alle ribosomalen RNA-Arten beobachtet, daneben auch in die schnell sedimentierende RNA des Sedimentes sowie in eine 9-12s RNA.

Bei der quantitativen Betrachtung des Nukleotideinbaus konnte eine Bevorzugung der 28s und 18s RNA nachgewiesen werden. Pro nmol RNA wurde bei der 28s RNA die 13,3-fache Menge und bei der 18s RNA die 8,8-fache Menge an radioaktivmarkierten Ribonukleotiden bezogen auf die 4-5s RNA eingebaut. Bei der gemessenen Radioaktivität der 4-5s RNA handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen Einbau in t-RNA. Der Einbau von Ribonukleotiden in t-RNA durch das beschriebene Enzym wurde von H. GOTTSCHLING²⁸ untersucht. Es konnte kein signifikanter Einbau von t-RNA festgestellt werden. Aus diesen Ergebnissen könnte sich ein Hinweis auf die biologische Funktion des Enzyms ergeben. Das Enzym könnte in den Funktionszustand der Ribosomen eingreifen und eine Rolle bei der Proteinbiosynthese spielen. AUGUST und SMITH¹ deuten die von ihnen gefundene Poly-A-Synthese an Ribosomen von *Escherichia coli* in ähnlicher Weise. Doch bedarf es weiterer Experimente, um diese Hypothese zu belegen.

Die grobe Trennung in Fluffy Layer- und Pellet-Fraktion sowie die Auftrennung der Mikrosomen durch Saccharose-Gradienten Zentrifugation zeigen, daß sich die Hauptaktivität des Enzyms in den schnell sedimentierenden,

schweren Komponenten der Mikrosomen befindet. Es könnte sich um ein membrangebundenes Enzym des ergastoplasmatischen Retikulums handeln. Da alle Fraktionen des Gradienten eine enzymatische Aktivität aufweisen, kann aus dieser Verteilung der Schluß gezogen werden, daß in der Mikrosomenfraktion der größte Teil des Enzymproteins an den schweren Komponenten strukturgebunden ist, ein weiterer Teil an den partikulären Komponenten (Ribosomen) adsorbiert ist und der Rest in freier Form vorliegt.

In dieser Arbeit beschriebene Versuche machen es wahrscheinlich, daß der Einbau der Nukleotide am terminalen 3'-Ende von Ribonukleinsäuren erfolgt. Der Beweis hierfür konnte durch weitere Experimente, die von H.J. PREUSS durchgeführt wurden, erbracht werden.

Bei der Betrachtung der in der Literatur veröffentlichten Arbeiten über die Untersuchung der Eigenschaften des Enzyms und des Reaktionsproduktes lassen sich die folgenden gemeinsamen Fragestellungen herausarbeiten

1. DNA-Abhängigkeit der Reaktion, der Effekt von Actinomycin D und Desoxyribonuklease.
2. Triphosphat-Abhängigkeit der Reaktion.
3. RNA-Abhängigkeit der Reaktion.
4. Charakterisierung des Reaktionsproduktes und Analyse derjenigen RNA-Komponenten, in die ein Einbau von Ribonukleotiden stattfindet.
5. Synthese einer terminalen homopolymeren oder heteropolymeren Sequenz.

Anhand der Tabelle X sind die verschiedenen oben genannten Punkte vergleichend zusammengestellt, so daß sich

Tab. X: Gegenüberstellung der in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse

Autor	Material	DNA, DNase-, Aktinomycin- Abhängigkeit	Ribonukleosidtri- phosphat-Abhän- gigkeit		RNA-Ab- hängig- keit	Reaktionspro- dukt (RNA- Komponente)	hetero- oder homopolymere Sequenz
			ein Tri- phosphat	Vier Tri- phosphate			
WILKIE u. SMELLIE 31, 32	Rattenlebermi- krosomen		↓	↑	+	nicht un- tersucht	wahrscheinl. homopolymer
	a) Gesamtmikro- somenfraktion	∅	↑	↓	+	kurzkettige RNA (nicht 5s u. t-RNA)	"
	b) Subfraktion. -Free Ribosom. RSVLc)	∅	↓	↑	+	kurzkettige RNA	"
	Ascites-Tumor- Zellen	∅	↑	↓	+	5, 18, 28sRNA	"
DALGARNO 9	105000g-Sedi- ment von As- cites Tumor- zellen	∅	↑	↓	+	nicht un- tersucht	nicht unter- sucht
SCHNEIDER u. KUFF 24	Rattenlebermi- krosomen	∅	↓	↑	+	nicht un- tersucht	wahrscheinl. heteropolymer
STRAUSS GOLDWASSER 27	Taubenleber- mikrosomen	nicht un- tersucht	↓	↑	+	hauptsächl. 18 u. 28s-RNA, 4-5s RNA, alle übrigen RNA-Komponen- ten	nicht unter- sucht
Eigene Ergebnisse	Mikrosomen v. Hühnerembryo- nen	∅	↑	↓	+		

a) bedeutet geringeren Einbau gegenüber
b) bedeutet höheren Einbau gegenüber
c) RSVL = rough-surfaced vesicle light fraction

auf diese Weise eine Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse mit denen der Literatur durchführen läßt. Dabei wurden nur Arbeiten berücksichtigt, in denen Untersuchungen der Nukleotidyltransferaseaktivität der Mikrosomenfraktion durchgeführt wurden.

Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen ist in folgenden Punkten gegeben:

1. Die beschriebene Nukleotidyltransferaseaktivität ist DNA-unabhängig. Die Reaktion wird durch Aktinomycin D und Desoxyribonuklease nicht inhibiert.
2. Die Reaktion ist RNA-abhängig. RNA hat Primerfunktion.

Das Reaktionsprodukt wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben:

WILKIE und SMELLIE^{31,32} und WYKES und SMELLIE³³ fanden keinen Einbau von markierten Ribonukleotiden in ribosomale RNA. Sie stellten eine Synthese von endständigen vermutlich homopolymeren Ribonukleotidsequenzen in kurzkettige, langsam sedimentierende RNA-Komponenten fest. Einen Einbau in t-RNA konnten sie ausschließen.

DALGARNO, MARTIN, LIU und WORK⁹ beschrieben den Einbau von Ribonukleotiden in alle RNA-Komponenten mit deutlicher Bevorzugung der Fraktion, die 5s- und t-RNA enthält. Als Untersuchungsmaterial benutzten sie virusinfizierte sowie nicht infizierte Aszites-Tumorzellen. Es blieb offen, ob hier eine Tumor-bedingte Veränderung des Stoffwechsels vorliegt.

Bei den eigenen Versuchen wurden Nukleotide bevorzugt in die 28s und 18s RNA sowie in geringerem Maße in die 4-5 s RNA eingebaut.

Ergebnisse über den Einbau von Nukleotiden in parti-kuläre Einzelkomponenten der Mikrosomenfraktion (CIIIIa) fehlen in der Literatur.

Unterschiedliche Ergebnisse werden bei der Messung der Ribonukleotidabhängigkeit der Reaktion beschrieben. Die in dieser Arbeit beschriebene enzymatische Aktivität benötigt nur ein Ribonukleosidtriphosphat als Substrat und wird durch die Anwesenheit der drei anderen Triphosphate zum Teil gehemmt. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Versuchen von WILKIE und SMELLIE³² (free ribosome-Subfraktion), WYKES und SMELLIE³³ und DALGARNO et al.⁹. Sie stehen jedoch im Widerspruch mit anderen Ergebnissen von WILKIE und SMELLIE³¹ (Gesamte Mikrosomenfraktion) sowie den Ergebnissen von STRAUSS und GOLDWASSER²⁷. Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse sind wegen der Heterogenität des untersuchten Materials, der Mikrosomenfraktion, schwer vergleichbar. Diese Zellfraktion ist nur durch ihr Sedimentationsverhalten charakterisiert. In funktioneller Hinsicht liegt ein heterogenes Gemisch verschiedener Zellpartikel vor (Ribosomen, Membranen, Golgi-Apparat). Die Zusammensetzung dieser heterogenen Fraktion ist von den jeweiligen Präparationsbedingungen abhängig. Dadurch wird der Vergleich der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen erschwert.

Weitere Untersuchungen zur Reinigung, Isolierung und Charakterisierung des Enzyms sind erforderlich, um seine Eigenschaften und vor allem seine Funktion in den Zellen besser zu verstehen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Mikrosomenfraktion von Hühnerembryonen enthält eine Nukleotidyltransferase, die den Einbau von Ribonukleotiden in RNA katalysiert.
2. Die Reaktion ist Magnesium- und RNA-abhängig.
3. Die Reaktion ist DNA-unabhängig. Sie wird durch Aktinomycin D und Deoxyribonuklease nicht gehemmt.
4. Das Enzym benötigt nur ein Ribonukleosidtriphosphat als Substrat. Der Zusatz der drei anderen Triphosphate zum Reaktionsgemisch führt zu einer Hemmung des Einbaus.
5. Substrate der mikrosomalen Nukleotidyltransferase sind Triphosphate. Diphosphate erfüllen diese Funktion nicht.
6. Natriumpyrophosphat, Ammoniumsulfat, Ribonuklease und Calcium hemmen die Reaktion.
7. Ein Einbau von Ribonukleotiden findet in Disomen, Monosomen und die Ribosomenuntereinheiten sowie die langsam sedimentierende Komponente der Mikrosomenfraktion statt.
8. Alle RNA-Komponenten der Mikrosomenfraktion werden durch den Einbau von Ribonukleotiden markiert. Signifikant sind die hohen Einbauraten der 28s und 18s RNA, die gegenüber der 4-5s RNA einen 13,3 bzw. 8,8-fach höheren Einbau aufweisen.

F. LITERATUR

1. AUGUST, J.T., ORITZ, P. und HURWITZ, J.,
J. biol. Chemistry 237, 3786 (1962)
2. BELL, E., Nature (London) 224, 326 (1969)
3. BLATTI, S.P., INGLES, C.J., LINDELL, T.J.,
MORRIS, P.W., WEAVER, R.F., WEINBERG, F. und
RUTTER, W.G., Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol. XXXV, 649 (1971)
4. BRITTEN, R.J. und ROBERTS, R.B., Science (Washing-
ton) 131, 32 (1960)
5. BURDON, R.H. und SMELLIE, R.M.S., Biochim. Bio-
physica Acta (Amsterdam) 61, 633 (1962)
6. CHAMBERLIN, M. und BERG, P., Proc. Nat. Acad. Sci.
U. S. 48, 81 (1962)
7. CHAUVEAU, J., MOULE, Y. und ROUILLER, Ch., Exp.
Cell Res. 11, 317 (1956)
8. CHUNG, C.W., MAHLER, H.R. und ENRIONE, M., J. biol.
Chemistry 235, 1448 (1960)
9. DALGARNO, J.E., LIU, S.L. MARTIN, E.M. und WORK, T.S.,
J. Mol. Biol. 15, 77 (1966)
10. DANIEL, V. und LITTAUER, U.Z., J. biol. Chemistry
238, 2102 (1963)
11. EASON, R. und SMELLIE, R.M.S., J. biol. Chemistry
240, 2580 (1965)
12. FUCHS, E., ZILLIG, W., HOFSCHEIDER, P.H. und PREUSS,
A., J. Mol. Biol. 10, 546 (1964)

13. GROS, F., GILBERT, W., ATTARDI, G., SPAHR, P.F.
und WATSON, J.D., Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. XXVI, 111 (1961)
14. HARBERS, E. und HEIDELBERGER, C., Biochem. Bio-
physica Acta (Amsterdam) 35, 381 (1959)
15. HECHT, L.I., ZAMECNIK, P.C., STEPHENSON, M.L. und
SCOTT, J.F., J. biol. Chemistry 233, 954 (1958)
16. HORTON, E., LIU, S.L. MARTIN, E.M. und WORK, T.S.,
J. Mol. Biol. 15, 62 (1966)
17. KIRBY, K.J., Biochem. J. 64, 405 (1956)
18. KLEMPERER, H.G., Biochim. Biophysica Acta (Amsterdam)
72, 403 (1963)
19. KRAKOW, J. und OCHOA, S., Biochem. Z. 338, 796 (1963)
20. NAKAMATO, T., FOX, C.F. und WEISS, S.B., J. biol.
Chemistry 239, 167 (1964)
21. PREISS, J., DIECKMANN, M. und BERG, P.J. J. biol.
Chemistry 236, 1748 (1961)
22. PREUSS, H.J., NOAH, E., BORN, J., GOTTSCHLING, H.
und TIEDEMANN, H., Hoppe-Seylers Z. Physiol.
Chem. 351, 1460 (1970)
23. RHO, J.H. und BONNER, J., Proc. Nat. Acad. Sci. U.
S. 47, 1611 (1961)
24. SCHNEIDER, W.C. und KUFF, E.L., J. biol. Chemistry
244, 4883 (1969)
25. SMITH, M. und AUGUST, J.T., J. biol. Chemistry 241,
3525 (1966)
26. SPIRIN, A.S. und GAVRILOVA, L.P.: "The Ribosome",
Springer Berlin-Heidelberg-New York (1969)

27. STRAUSS, D.B. und GOLDWASSER, E., J. biol. Chemistry 236, 849 (1961)
28. TIEDEMANN, H. und TIEDEMANN, H., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 306, 132 (1956)
29. VENTKATARAMAN, P.R. und MAHLER, H.R., J. biol. Chemistry 238, 1058 (1963)
30. WEISS, S., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 46, 1020 (1960)
31. WILKIE, N.M. und SMELLIE, R.M.S., Biochem. J. 109, 229 (1968)
32. WILKIE, N.M. und SMELLIE, R.M.S., Biochem. J. 109, 485 (1968)
33. WYKES, J.R. und SMELLIE, R.M.S., Biochem. J. 99, 387 (1966)

G. Zusammenstellung der im Text gebrauchten Abkürzungen

ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
AMP	= Adenosin-5'-monophosphat
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
[5- ³ H]ATP	= Adenosin-5-Tritium-5'-triphosphat
CDP	= Cytidin-5'-diphosphat
CTP	= Cytidin-5'-triphosphat
CPM	= counts per minute
DNA	= Deoxy-Nucleic-Acid = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid = Äthylendiamintetraessigsäure
g	= Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
GDP	= Guanosin-5'-diphosphat
GTP	= Guanosin-5'-triphosphat
p.a.	= pro analysi
-pCpCpA	= Adenolyl 5'→ 3' Cytidyl 5'→ 3' Cytidyl 5'→ 3' RNA
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PK	= Pyruvat Kinase
Poly-U	= Polyuridylsäure
PP	= Pyrophosphat
RNA	= Ribo-Nucleic-Acid = Ribonukleinsäure
t-RNA	= Transfer RNA
s-RNA	= soluble RNA = lösliche RNA (5s + t-RNA)
TCE	= Trichloressigsäure
U/Min.	= Umdrehungen pro Minute
UDP	= Uridin-5'-diphosphat
[5- ³ H] UDP	= Uridin-5-Tritium-5'-diphosphat
UMP	= Uridin-5'-monophosphat
UTP	= Uridin-5'-triphosphat
[5- ³ H] UTP	= Uridin-5-Tritium-5'-triphosphat
v/v	= volume/volume = Volumen/Volumen
v/w	= volume/weight = Volumen/Gewichtseinheit

LEBENS LAUF

Am 5. November 1939 wurde ich, Ernst Noah, als Sohn des Polizeibeamten Ernst Noah und seiner Ehefrau Erna Noah geb. Reinecke in Quedlinburg geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Hohenkirchen/Kreis Friesland, von 1950 bis 1956 das Progymnasium in Hohenkirchen/Kreis Friesland und von 1956 bis 1959 das Mariengymnasium in Jever/Kreis Friesland, wo ich am 13.3.1959 das Abitur ablegte. Von 1959 bis 1962 leistete ich Wehrdienst in der Bundeswehr. Von 1962 bis 1964 war ich als Apotheker-Praktikant tätig. Am 9.3.1964 bestand ich das Pharmazeutische Vorexamen. Im Wintersemester 1964/65 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Ich studierte ohne Ausnahme ausschließlich in Berlin. Am 14.4.1971 schloß ich das Studium mit dem Staatsexamen ab.

